TEILREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER SAUREN SPHINGOMYELINASE (EC 3.1.4.12) AUS NORMALEM UND PATHOLOGISCHEM (M. NIEMANN–PICK TYP C) MENSCHLICHEM HIRNGEWEBE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Helmut Müller

aus Niederlahnstein

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0007

TEILREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER SAUREN SPHINGOMYELINASE (EC 3.1.4.12) AUS NORMALEM UND PATHOLOGISCHEM (M. NIEMANN–PICK TYP C) MENSCHLICHEM HIRNGEWEBE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Helmut Müller

aus Niederlahnstein

1979

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 1979

Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Harzer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. J. Peiffer) durchgeführt.

Besonderen Dank für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit richte ich an Herrn Prof. Dr. K. Harzer, Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Frau I. Schuster.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Nothwang, Kreiskrankenhaus Reutlingen, für die Bereitstellung des pathologischen Gewebes vom M. Niemann-Pick-Typ-C-Fall.

Abkürzungsverzeichnis

aq. dest.	einfach destilliertes Wasser
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
NPC	Morbus Niemann-Pick Typ C
SM	Sphingomyelinase
TCA	Trichloressigsäure
Tris/HCl	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan-HCl-Puffer
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure

Geräte

Spektralphotometer (Zeiss) PM2 DL;

Szintillationszähler betaszint BF 5000 (Berthold)

Betakamera BF 290 A (Berthold)

Dünnschicht-Scanner II LB 2723 (Berthold)

pH-Meter E 510 (Metrohm, Herisau)

Ultra-Turrax Typ TP 18/2 (Jahnke-Kunkel KG, Stauffen i.Br.)

Sorvall-Kühlzentrifuge RC 2-B, SS-34 Rotor

Ultrazentrifuge Spinco L-50, Rotor SW 50

Microcol TDC 80 - Fraktionssammler (Gilson)

Uvicord II UV-Durchfluß-Spektralphotometer (LKB)

Chemikalien

^{14}C-Sphingomyelin von NEN, Boston, Mass. (No. NEC 663), spezifische Aktivität 75 /uCi/mMol; das markierte Substrat wurde mit Chloroform/Methanol (2:1) auf 0.043 mMol verdünnt.

Unmarkiertes Sphingomyelin und α-Methyl-D-Mannosid von Sigma, München.

Phosphorylcholin von Boehringer, Mannheim, No. 15156.

Triton X-100, Rinderserumalbumin und Natrium-Dodecylsulfat von Serva, Heidelberg.

Concanavalin-A-Sepharose 4B und Sephadex LH-60 (Partikelgröße 40 - 120 /um) von Pharmacia, Uppsala (Schweden).

Insta-Gel von Packard.

Selectron BA-90 Filter (25 mm Ø und 0.6 /um Porengröße) von Schleicher & Schüll, Dassel.

Celluloseacetatstreifen (40 x 360 mm/ no. 11200) von Sartorius, Göttingen.

DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator), Schichtdicke 0.25 mm, Art. 5721; 2-Mercaptoäthanol zur Synthese; Amidoschwarz 10 B für die Elektrophorese und Glycerin (etwa 87 %) p.a. von Merck, Darmstadt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Herkunft der Gewebe	11
2.2.1.	Enzymtests	11
2.2.2.	Enzymeinheiten	13
2.3.	Proteinbestimmungen	14
2.4.	Reinigung der SM	15
2.5.	Test auf weitere saure, lysosomale Hydrolasen	16
2.6.	Molekulargewichtsbestimmung	20
2.7.	Zentrifugationsversuch zum Ausschluß einer partikelgebundenen Form der SM	20
3.	Ergebnisse	22
3.1.	Reinigung der SM	22
3.2.	Prüfung auf Fremdaktivitäten	28
3.3.	Charakterisierung der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe mit anschließendem Vergleich der Parameter und Eigenschaften beider Enzyme	29
3.4.	Zentrifugationsversuch zum Ausschluß einer partikelgebundenen Form der SM	29
3.5.	Untersuchungen zur Substratspezifität der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe	40
4.	Diskussion	41
5.	Zusammenfassung	45
6.	Literaturverzeichnis	47

1. Einleitung

Sphingomyelin ist das am häufigsten auftretende Sphingolipid in menschlichen Geweben. Sein Katabolismus wird durch das Enzym Sphingomyelinase EC 3.1.4.12 (SM), eine saure lysosomale Hydrolase, initiiert und führt zu den Produkten Phosphorylcholin und Ceramid (Kanfer et al., 1966). Neben dieser sauren Sphingomyelinase (SM; pH-Optimum nahe 5.0), kennt man eine neutrale Sphingomyelinase mit einem pH-Optimum um 7.0 (Schneider und Kennedy, 1967; Rao und Spence, 1976; Gatt, 1976). Dieses neutrale Enzym ist magnesiumabhängig und tritt besonders im Gehirn auf. Die Niemann-Pick-Krankheit ist eine infantil auftretende Lipidspeicherkrankheit mit fortschreitendem cerebralem Verfall, Hepatosplenomegalie, Schaumzellen im Knochenmark und gelegentlichem Auftreten eines "kirschroten Flecks" im Augenhintergrund. Biochemisch gesehen beruhen die cerebrale und viscerale Speicherung von Sphingomyelin (besonders im reticulo-endothelialen System) auf einem fast kompletten Mangel an SM-Aktivität (Brady et al., 1966).

Neben diesem klassischen Typ des M. Niemann-Pick, der auch Typ A genannt wird (Crocker, 1961), gibt es weitere vier Typen, die mehr oder weniger vergleichbar sind mit dem klassischen Typ A.

Der Typ B ist eine chronisch-visceral auftretende Form ohne cerebrale Beteiligung, jedoch mit SM-Mangel zumindest außerhalb des Zentralnervensystems (Fredrickson und Sloan, 1972).

Wesentlich weniger klar beschrieben ist Crocker's Typ C. Unter dieser Bezeichnung versteht Crocker Fälle von neurovisceralen Lipidosen, die klinisch vergleichbar sind mit dem Typ A, jedoch meist mit verzögertem klinischem Verlauf und geringerer Visceromegalie einhergehen. Heute läßt sich der M. Niemann-Pick Typ C (NPC)* vor allem durch Ausschluß (aufgrund biochemischer Untersuchungen), sowohl der Typen A und B der Erkrankung als auch anderer, gut gekennzeichneter neurovisceraler Lipidosen, wie z.B. der Gaucher-Krankheit, diagnostizieren (Harzer et al., 1978). Der Begriff NPC umfaßt eine heterogene Gruppe von Fällen; eine biochemische Gemeinsamkeit scheint darin zu bestehen, daß Sphingomyelin und andere Lipide in der Milz weniger stark erhöht sind als bei Typ A und B (2 - 5 fach bei Typ C und 10 - 30 fach bei Typ A und B).

Aus Untersuchungen einiger Arbeitsgruppen, die sich mit der SM bei NPC-Fällen beschäftigten (Fredrickson und Sloan, 1972; Harzer und Benz, 1973; Callahan et al., 1974; Karpati et al., 1977; Baraton und Revol, 1977), wurde klar, daß die SM beim Typ C nie grundlegend defekt oder wesentlich erniedrigt ist. Unklar bleibt nur, in wie weit eine teilweise Erniedrigung der SM-Aktivität

* oder einfach "Typ C"

und das angebliche Fehlen von Isoenzymen (Callahan et al., 1975) signifikant sind für den Typ C.
Die Bedeutung der neutralen Sphingomyelinase für den M. Niemann-Pick ist unbekannt.
Im Zusammenhang mit den SM-Untersuchungen befassen sich auch einige Arbeiten mit dem physiko-chemischen Verhalten des Sphingomyelins in wässrigen Lösungen (Cooper et al., 1974; Yedgar et al., 1974, 1975; Yedgar und Gatt, 1976).
Besonders in der Arbeit von Yedgar und Gatt (1976) wird gezeigt, daß je nach Konzentration von Sphingomyelin und Triton X-100 als nichtionischem Detergens verschiedene Dispersionszustände durchlaufen werden. Unterhalb einer Triton-Konzentration von 0.2 mM liegt Sphingomyelin in Form doppelmembraniger Liposomen vor. Bei höheren Konzentrationen des Detergens wird das Lipid gelöst und es bilden sich Mischmizellen aus Triton X-100 und Sphingomyelin. Die Natur dieser Mischmizellen ist nun abhängig von dem molaren Verhältnis von Triton zu Sphingomyelin. Bei einem Verhältnis zwischen 0.5 und 4.0 ist das System homogen und monodispers. In diesem Bereich variiert der Anteil von Sphingomyelinmolekülen in einer Mischmizelle zwischen 50 und 440, wenn sich z.B. das Triton/Sphingomyelin-Verhältnis von 4.0 zu 0.5 verändert. Dabei bleibt die Aggregationszahl von Triton konstant, und zwar ca. 200, unabhängig vom Triton/Sphingomyelin-Verhältnis.

Daraus folgt, daß die Konzentration der Mischmizellen eine lineare Funktion nur der Detergenzkonzentration darstellt. Starke Detergenzeinflüsse zeigen sich auch bei Elektrofokussiermustern der SM (Besley, 1976; Harzer et al., 1977), wobei Besley zeigt, daß der pI des Haupt-SM-Gipfels durch Zugabe von 0.1 % Triton X-100 sich weit ins basische hinein verlagert.
Widersprüchliche Aussagen werden gemacht zur Frage der Existenz von Isoenzymen der SM, die angeblich durch isoelektrische Fokussierung auftrennbar sind, und über das Fehlen von "Isoenzym II" (pI 5.2) bei NPC (Callahan et al., 1974). Harzer et al., 1977, können, ausgehend von einem 10-fach verdünnterem Homogenat, diese Isoenzymtheorie nicht bestätigen, sie sind im Gegenteil eher der Meinung, daß der NPC nicht direkt etwas mit der Sphingomyelinase zu tun hat. Der Term "M. Niemann-Pick Typ C" wird in Frage gestellt, da mit dem Eigennamen immer die SM in Verbindung gebracht wird.
Beim Typ C wird die Lipidspeicherung ja nicht nur durch Sphingomyelin sondern, in vergleichbarem Grad, auch durch andere Lipide wie Monosialoganglioside (Oppenheimer et al., 1967; Philippart et al., 1969) im Gehirn, Glucosylceramid in der Milz (Dacremont et al., 1974) und Lysobisphosphatidsäure in der Leber (Karpati et al., 1977) hervorgerufen.
Seit einigen Jahren versucht man, für die SM künstliche, chromogene Substrate zu synthetisieren, um das Arbeiten mit SM billiger und für einfacher eingerichtete Labors möglich zu machen. Gal et al. (1975) beschreiben das

2-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-Phosphorylcholin und Fensom et al. (1977) vergleichen mehrere künstliche Substrate, wie bis(4-Methylumbelliferyl)pyrophosphatdiester, bis(4-Methylumbelliferyl)phosphat, bis(p-Nitrophenyl)phosphat und bis(4-Methylumbelliferyl)pyrophosphat.
Nach eigener und der in der neuesten Literatur niedergelegten Erfahrung stellt die Anwendung dieser künstlichen Substrate keine brauchbare Alternative zum radioaktiv markierten natürlichen Substrat dar. In einer neuen Arbeit von Gatt (1978) wird allerdings ein chromophores Substratderivat, das N-ω-trinitrophenylaminolaurylsphingosylphosphorylcholin (TNPAL) beschrieben, mit weitgehend übereinstimmenden Eigenschaften mit dem ^{3}H-markierten natürlichen Substrat.

Über die Reinigung der SM erschienen bisher erst zwei Arbeiten, in denen Anreicherungsfaktoren für das Enzym von über 500 gegenüber dem Extrakt erzielt werden (Yamaguchi und Suzuki, 1977; Pentchev et al., 1977). Frühere Arbeiten beschreiben Faktoren, die kaum über 100 lagen (Schneider und Kennedy, 1967, aus menschlicher Milz; Sloan, 1972, aus menschlicher Leber; Rao und Spence, 1976, aus menschlichem Hirn).

Ziel dieser Arbeit war es, eine brauchbare Teilreinigung der SM aus normalem und pathologischem (NPC) Hirngewebe zu erreichen, wobei mehr auf hohe Ausbeute und schonendes Verfahren als auf hohe Anreicherung geachtet

wurde, da von dem pathologischen Gewebe sehr wenig vorlag und somit viele Reinigungsschritte zu riskant waren. Allerdings hat eine Reihe von Versuchen mit - reichlich vorhandenem - Normalgewebe gezeigt, daß weitere Reinigungsschritte der SM ohnehin problematisch und mit konventionellen Methoden kaum durchführbar sind. Dies steht teils im Gegensatz zu der zitierten Literatur; die beschriebenen Verfahren scheinen nicht ohne weiteres reproduzierbar zu sein.

2. Material und Methoden

2.1. Herkunft der Gewebe:

Das Kontroll-Hirngewebe stammte von einem 1 1/2 jährigen an einem Tumorleiden gestorbenen Kind (männl.), das pathologische Hirngewebe von einem 4 1/2 jährigen an M. Niemann-Pick Typ C (NPC) gestorbenen Mädchen (Fall genau beschrieben bei Harzer et al., 1978).

2.2.1. Enzymtests

Die SM wird in einem Standardansatz mit einem Gesamtvolumen von 0.120 ml getestet. Er enthält 1 nmol ^{14}C-Sphingomyelin und 9 nmol unmarkiertes Sphingomyelin, welche beide, in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst, in die Reaktionsgefäße gegeben und zunächst unter Stickstoff getrocknet werden. Anschließend werden 100 µl 0.1 M Na-Acetat-Puffer mit Detergens (pH 5.0, 0.1 % Triton X-100) zugegeben.
Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung. Die Inkubationsperiode der Testansätze beträgt 2 Std. bei 37°C. Zur quantitativen Bestimmung der Abbaurate bzw. Sphingomyelinase-Aktivität sind zwei voneinander völlig unabhängige Methoden anwendbar.
Die eine Methode beruht auf der Möglichkeit, das einge-

setzte radioaktiv markierte Substrat (^{14}C-Sphingomyelin) dünnschichtchromatographisch vom Reaktionsprodukt (Phosphorylcholin) abzutrennen. Das Sphingomyelin ist im Cholinrest (an allen Methylgruppen des quartenären Stickstoffs) markiert.

Von dem oben beschriebenen Testansatz werden nach Inkubation (Leerwert: nicht inkubiert) 50 µl auf DC-Fertigplatten gegeben (20 x 20 cm oder 10 x 20 cm) und in dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 14 : 6 : 1 chromatographiert. Unter diesen Bedingungen bleibt das Reaktionsprodukt (^{14}C-Phosphorylcholin) am Startpunkt liegen, während das Substrat (^{14}C-Sphingomyelin) mit einem Rf-Wert von ca. 0.3 abgetrennt wird.

Diese Methode kann einmal im Radioscan-Verfahren ausgewertet werden und führt hierbei zu halbquantitativen Aussagen, die des öfteren zum Auswerten der Säulenläufe ausgereicht haben. Zum anderen ist es möglich, die radioaktiven Produkt- und Substratflecken (nach Lokalisation mithilfe einer B-Kamera, Type BF 290 A) auszukratzen, mit Chloroform/Methanol (2:1) zu eluieren und im Szintillationszähler zu messen. Mit diesem Auskratzverfahren erzielt man bei der DC-Methode quantitative Ergebnisse.

Die zweite, hiervon unabhängige Methode basiert auf der Möglichkeit, Sphingomyelin in Gegenwart von Protein und Detergens und im Gegensatz zu Phosphorylcholin mit 2 %iger TCA-Lösung auszufällen.

Zwecks besserer Fällbarkeit und Phasenverteilung werden

zu 50 µl Testansatz vor der TCA jeweils noch 50 µl RSA (10 mg/ml) und 150 µl Phosphorylcholinlösung (1 mg/ml aq. dest.) zugesetzt. Das Präzipitat wird 10 Min. bei 46000 g abzentrifugiert, 250 µl des Überstandes entnommen (= 5/6; 1/6 des Überstandes verbleibt über dem Sediment) und anschließend der Überstand einerseits, sowie das Sediment mit 1/6 Überstand andererseits im Szintillationszähler mit Insta-Gel gemessen. Die Abbaurate wird unter Berücksichtigung des verbliebenen 1/6 Überstandes berechnet. Die Dünnschicht- und die TCA-Methode differieren in ihren quantitativen Ergebnissen um weniger als 5 %.

2.2.2. Enzymeinheiten

- 1 mU entspricht der Bildung von 1 nMol Phosphorylcholin in 1 Stunde bei 37°C unter Testbedingungen.
- spezifische Aktivität: mU/mg Protein der Enzymlösung.
- Volumenaktivität: mU/ml (nMol/h/ml)

2.3. Proteinbestimmungen

Für Proteinbestimmungen oberhalb einer Konzentration von 0.01 mg/ml fand die Methode von Heinzel (1960) in leicht modifizierter Form Verwendung (Baier; Diplomarbeit). Bei niedrigerer Proteinkonzentration wurde nach der ebenfalls leicht modifizierten Methode von Schaffner und Weissmann (1973) verfahren (Baier; Diplomarbeit).

Beide Methoden basieren auf der Anfärbbarkeit von Proteinen mit Amidoschwarz 10 B.

Die erste Methode arbeitet mit Celluloseacetatstreifen; vom Amidoschwarz 10 B werden 0.5 g in 45 ml Methanol, 45 ml H_2O und 10 ml Eisessig gelöst und damit die Proteinflecken 10 Min. gefärbt (10 bzw. 20 µl Enzymfraktion auftragen). Der Streifen wird 3 x 3 Min. entfärbt mit 475 ml Methanol + 475 ml H_2O + 50 ml Eisessig. Man stanzt die farbigen Proteinflecken aus, löst sie in 80 ml Ameisensäure + 10 ml Eisessig + 10 g TCA auf und mißt im Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gegen einen gleich behandelten Filterleerwert.

Bei der zweiten Methode finden Nitrozellulosefilter Verwendung. Das Amidoschwarz 10 B wird 0.1 %ig in 45 % Methanol, 45 % H_2O und 10 % Eisessig benutzt. Die Filter werden mit dieser Lösung 6 Min. gefärbt und anschließend mit einer Lösung, die 90 % Methanol, 2 % Eisessig und 8 % H_2O enthält, wieder entfärbt. Anders

als bei der ersten Methode wird der gebildete Protein-Farbstoff-Komplex mit einer alkalischen Alkohollösung (25 mM NaOH, 0.05 mM EDTA, 50 % Äthanol) vom Filter eluiert, und sodann wiederum bei 620 nm gegen einen entsprechend vorbereiteten Reagenzienleerwert gemessen. Als Standard dient bei beiden Methoden jeweils eine lineare Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin.

2.4. Reinigung der SM

Ein 25 %iges wäßriges Homogenat, hergestellt durch 2 x 20 sec. Ultra-Turrax-Behandlung, wird 1 Stunde bei 4°C gerührt. Nach Zentrifugieren (45 Min., 46000 g, 4°C) wird der Extrakt sofort auf eine mit aq. dest. 1 Stunde gewaschene Concanavalin-A-Sepharose-4B-Säule (0.5 x 1.5 cm) gegeben. Die Durchflußgeschwindigkeit liegt zwischen 0.5 und 1 ml/min.. Die Säule wird daraufhin zunächst mit dem fünffachen Säulenvolumen Puffer (pH 7.4, 0.01 M Tris/HCl, 10 % Glycerin, 0.1 % Triton X-100, 5 mM Mercaptoäthanol) und anschließend mit dem fünffachen Volumen 1 M NaCl in Puffer gewaschen. Dann Elution in 1-ml-Fraktionen mit Puffer, der jetzt aber zusätzlich 0.75 M α-Methyl-D-Mannosid enthält. Alle Arbeitsgänge finden bei 20°C statt. Erst die eluierten Fraktionen mit mindestens halb-maximaler Aktivität werden gepoolt. Je 2 ml des Pools, der bewußt nicht kon-

zentriert wurde (Verluste!), werden auf einer 5 Stunden mit dem genannten Puffer äquilibrierten Sephadex LH-60 Säule (0.8 x 50 cm) gelfiltriert (1.5 ml Fraktionen, Durchflußrate 2 ml/Std.). Die Enzymaktivität kommt als einheitlicher Peak kurz nach dem Ausschlußvolumen; Fraktionen mit mindestens 2/3 - maximaler Aktivität werden vereinigt. Dieser Pool wird zur Erstellung der Daten in Tabelle 2 verwandt.

2.5. Test auf weitere saure, lysosomale Hydrolasen.

1. Glucocerebrosidase: (Cerebrosid-ß-Glucosidase)

Die Glucocerebrosidase-Aktivität wird mit Hilfe des Radioscan-Verfahrens von Dünnschichtchrommatogrammen bestimmt. Als Substrat dient Glucosylceramid (s.S. 19), das im Ceramidanteil ^{3}H-markiert ist. Durch Glucocerebrosidaseeinwirkung wird der Glucosylrest vom Ceramid abgetrennt und dieser freie, ^{3}H-markierte Ceramidanteil wiederum dünnschichtchromatographisch vom Substrat abgetrennt, ausgekratzt, eluiert und gezählt. Damit besitzt man die Möglichkeit, den prozentualen Abbau von Glucosylceramid zu Ceramid + Glucosylrest zu bestimmen (Harzer, 1977).

2. Galaktocerebrosidase: (Cerebrosid-ß-Galaktosidase)

Die Bestimmung der Galaktocerebrosidase-Aktivität läuft genau analog zur oben beschriebenen Glucocerebrosidase-Aktivität. Als Substrat dient hierbei das ebenfalls im Ceramidanteil ^{3}H-markierte Galaktosylceramid (Harzer, 1977), Formel siehe S. 19.

Bei der sauren ß-Galaktosidase, der Arylsulfatase A und der ß-Hexosaminidase dienen jeweils synthetische, chromophore Substanzen als Substrat.

3. saure ß-Galaktosidase:

Als Substrat dient das p-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid, bei dem der p-Nitrophenylrest freigesetzt und bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wird (Harzer und Sandhoff, 1971).

4. Arylsulfatase A:

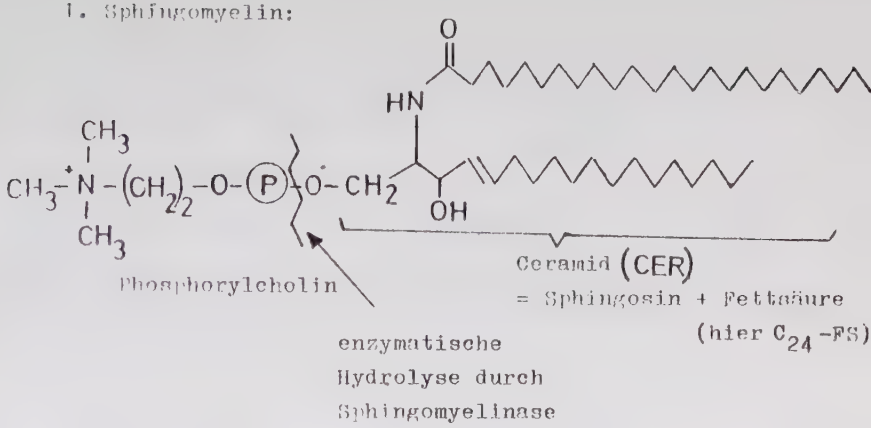
Als Substrat dient hier das 4-Nitrokatecholsulfat, von dem der nach erfolgter Reaktion freigewordene Nitrokatecholrest bei einer Wellenlänge von 515 nm bestimmt wird (Baum, 1959).

5. ß-Hexosaminidase:

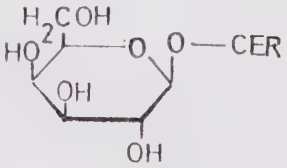
Bei dem Substrat p-Nitrophenyl-ß-D-N-Acetyl-Glucosamid wird durch Hexosaminidaseeinwirkung ebenfalls der Nitrophenylrest freigesetzt, der dann wiederum bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden kann. Diese Reaktion dient zur Bestimmung der Gesamt-Hexosaminidase-Aktivität, die sich zusammensetzt aus der Aktivität der beiden Isoenzyme Hexosaminidase A und Hexosaminidase B (Harzer und Sandhoff, 1971).

Drei der wichtigsten Sphingolipide

1. Sphingomyelin:

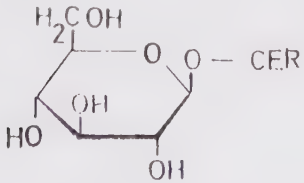


2. Galaktosylceramid:



Galaktosylrest

3. Glucosylceramid:



Glucosylrest

2.6. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe wurde an einer Sephadex LH-60 Säule (0.8 x 80 cm) - darauf wird in der Diskussion näher eingegangen - mit folgenden Markerproteinen durchgeführt:

Katalase	(1)	MG	230000
ß-Hexosaminidase	(2)	MG	130000
Hämoglobin	(3)	MG	68000
Cytochrom C	(4)	MG	17000

Das Ausschlußvolumen (v_o) der LH-60 Säule, mit Dextran-Blau bestimmt, beträgt 17 ml. Als Puffer diente der unter 2.4. beschriebene Präparationspuffer.

Temperatur: 4^oC

Laufgeschwindigkeit: ? ml/Stunde

2.7. Zentrifugationsversuch zum Ausschluß einer partikelgebundenen Form der SM

Neben der obengenannten Molekulargewichtsbestimmung, wollten wir ausschließen können, daß die SM bis zu dieser Reinigungsstufe noch in einem größeren molekularen Verband, als Partikel, vorliegt.

Dazu führten wir stufenweise Ultrazentrifugationen von unseren beiden Endfraktionen durch, beginnend mit 100000 x g/ 1 Std.. Nach jeweiliger Entnahme eines Aliquots vom Überstand wurde mit 150000 x g/ 1 Std. weiterzentrifugiert. Nach Entnahme von wiederum jeweils einem Aliquot des Überstandes und zweistündiger Zentrifugation mit 210000 x g wurde neben dem Überstand auch das scheinbare Pellet getestet.
Als Referenzenzym diente ß-Hexosaminidase, von der bekannt ist, daß sie unter diesen Bedingungen in Lösung vorliegt (Sandhoff und Wässle, 1971).
Ausgeführt wurden die Zentrifugationen mit einem SW-50-Rotor (swing-out) in einer Spinco L-50 Ultrazentrifuge.

3. Ergebnisse

3.1. Reinigung der SM

Tabelle 1 und 2 gibt die einzelnen Reinigungsschritte der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe wieder. Die beiden Tabellen repräsentieren nicht eine besonders gute Präparation, sondern es wurde jeweils eine durchschnittliche Reinigung angeführt.

Wie unterschiedlich die Präparationen erfolgen können, zeigt sich vielleicht an dem Verhältnis der Anreicherungen der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe: in den Tabellen 1 + 2 beträgt es 90 zu 50, während es in einer anderen Präparation 58 zu 70 betrug, wobei die Ausbeuten und auch der Proteingehalt, bis auf geringe Schwankungen, konstant blieben.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen typische Elutionsprofile der SM an Con-A-Sepharose und Sephadex LH-60. Die breite Schulter des Profils in Abb. 1 (Kontrollgewebe) bei Fraktion 17 - 30 wurde in ganz ähnlicher Weise aus NPC-Gewebe erhalten. Ein sicherer Hinweis auf die Existenz verschiedener Formen der SM (Isoenzyme) oder gar deren Variation bei der NPC-Krankheit ist aus den Profilen nicht zu bekommen.

Das aus NPC-Gewebe erhaltene Profil in Abb. 2 gleicht ebenfalls dem entsprechenden Profil aus Normalgewebe.

Tabelle 1: Reinigung der SK aus Kontrollgewebe.

6.1 g Hirn (Feuchtgewicht) in 23 ml aqua dest.

	Vol. (ml)	Protein gesamt (mg)	spezif. Akt. (nmol/h/mg Prot.)	Aktivität gesamt (nmol/h)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Homogenat	23	237	4.65	1102	100	1
Extrakt	16	48	18.9	907	82	4.1
ConA-Sepharose 4B	10	0.5	803.0	402	36.5	173
Sephadex LH-60 -	35	0.21	1663.0	341	31	358

- Enzym von 5 Gelfiltrationen gepoolt

Tabelle 2: Reinigung der SM aus NPC-Gewebe.

5.0 g Hirn (Feuchtgewicht) in 20 ml aqua dest.

	Vol. (ml)	Protein gesamt (mg)	spezif. Akt. (nmol/h/mg Prot.)	Aktivität gesamt (nmol/h)	Ausbeute (%)	Reinigung (-fach)
Homogenat	20	226	2.7	610	100	1
Extrakt	14	42	17.5	735	121	6.5
ConA-Sepharose 4B	7.5	0.31	610.0	189	31	226.0
Sephadex LH-60 +	11.5	0.17	994.0	169	28	368.0

+ Enzym von 4 Gelfiltrationen gepoolt

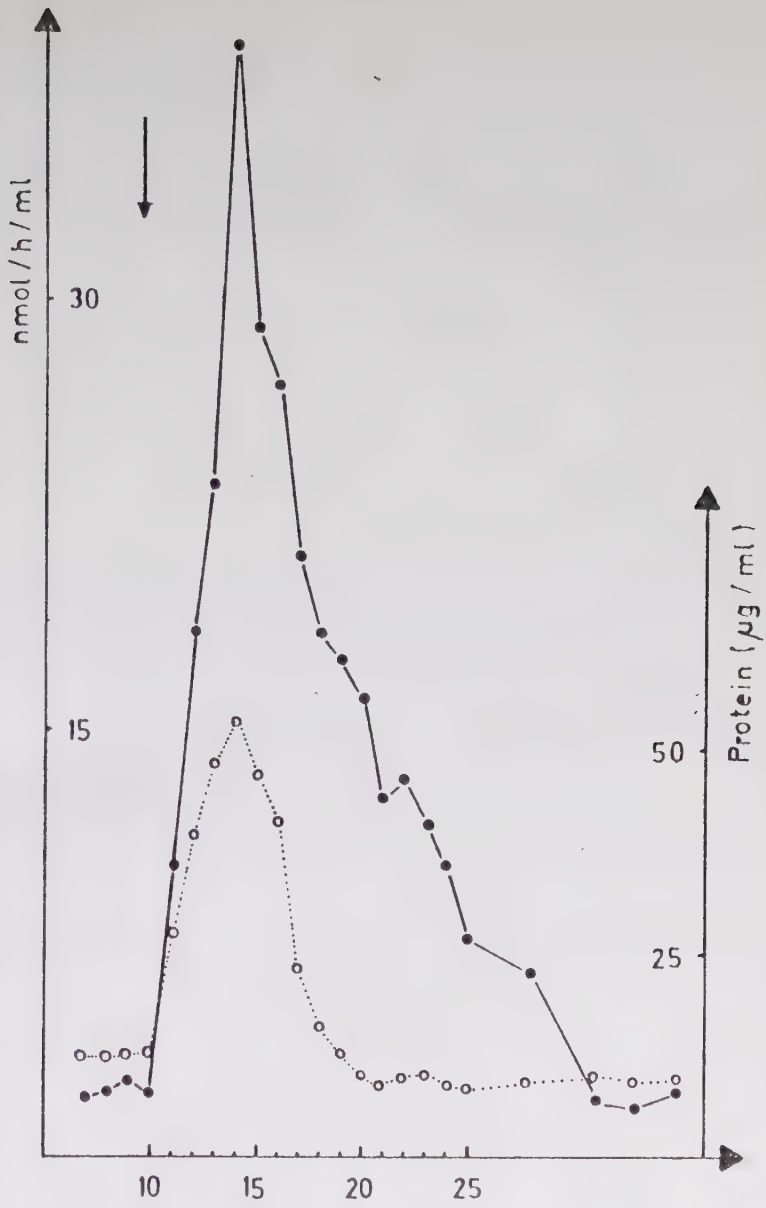


Abb. 1

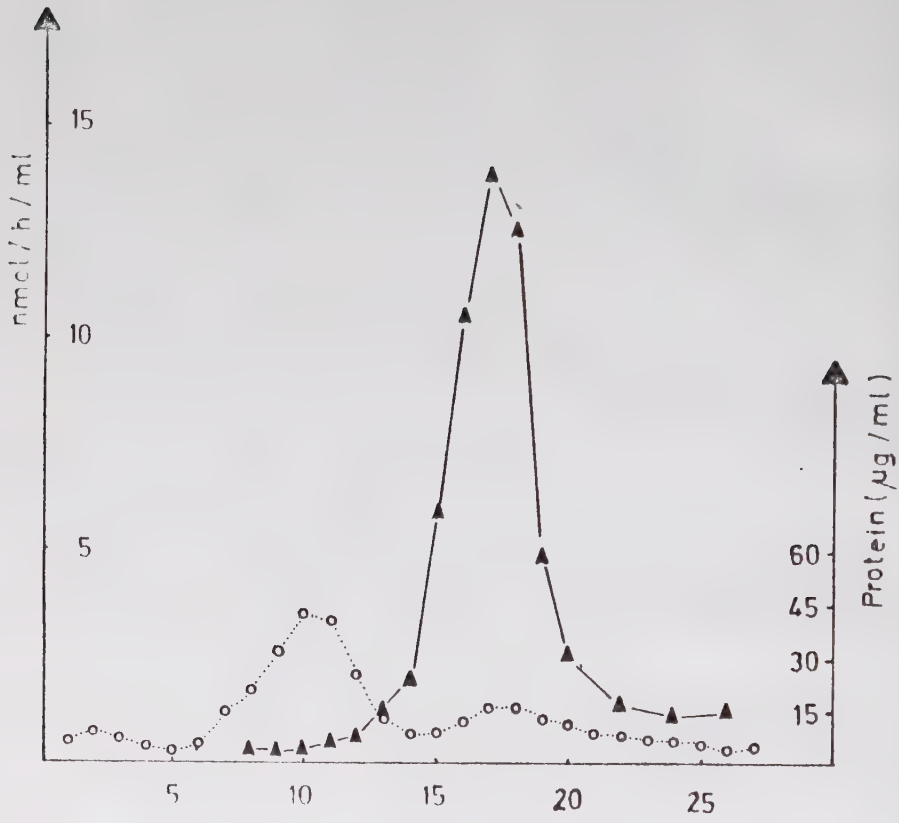


Abb. 2

Abb.1: Elutionsdiagramm der ConA-Sepharose 4B Säule von der Präparation aus Kontrollgewebe.

●———● Volumenaktivität

o·····o Protein in µg/ml

◄——— Beginn der Elution mit 0.75 M α-Methyl-D-Mannosid in Reinigungspuffer (pH 7.4; 0.01 M Tris/HCl, 10 % Glycerin, 0.1 % Triton X-100, 5 mM Mercaptoäthanol)

Säulenmaße: 0.5 x 1.5 cm
Säulenauftrag: 16 ml
Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/Min.

Abb. 2: Elutionsdiagramm der Sephadex LH-60 Säule von der Präparation aus NPC-Gewebe.

▲———▲ Volumenaktivität

o·····o Protein in µg/ml

Säulenmaße: 0.8 x 50 cm
Durchflußgeschwindigkeit: 2 ml/Std.
Der ConA-Sepharose-Pool (8 - 12 ml) wird in jeweils 2 ml-Portionen auf die Sephadex LH-60 Säule gegeben und bei 4^{0} C chromatographiert.

3.2. Prüfung auf Fremdaktivitäten

Die Endfraktionen unserer SM-Reinigung aus Kontroll- und NPC-Gewebe werden auf noch vorhandene Aktivitäten verwandter lysosomaler Enzyme getestet:

	Kontroll-	NPC-Gewebe
	(/uMol/h/mg Protein)	
Glucocerebrosidase	0.0	0.0
Galaktocerebrosidase	0.0	0.018
saure ß-Galaktosidase	13.0	14.9
Arylsulfatase A	17.8	22.4
total-ß-Hexosaminidase	369.0	603.0

3.3. Charakterisierung der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe mit anschließendem Vergleich der Parameter beider Enzyme.

Mit den nicht weiterbehandelten Endfraktionen der SM aus beiden Geweben (Tabelle 1 und 2) werden nun im folgenden die in den Abbildungen 3 - 8 wiedergegebenen Parameter und Eigenschaften ermittelt.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in Tabelle 3 dargestellt.

3.4. Zentrifugations-Versuch zum Ausschluß einer partikelgebundenen Form der SM.

Nach zweistündiger Zentrifugation bei 210000 x g konnte nur ein sehr kleiner Anteil (ca. 2 %) der SM sedimentiert werden. Dies spricht dafür, daß die SM zumindest nicht an größere Partikel (Membranbruchstücke) gebunden vorliegt. Nach Sandhoff und Wässle, 1971, ist die ß-Hexosaminidase (MG: 130000) durch 7-stündige Zentrifugation bei 400000 x g sedimentierbar. Es ist anzunehmen, daß auch die SM, bis auf die 2 %, die sedimentiert wurden, wie die ß-Hexosaminidase in einer Lösung vorliegt, bei der die subzellulären Partikel und Teilpartikel abgetrennt sind.

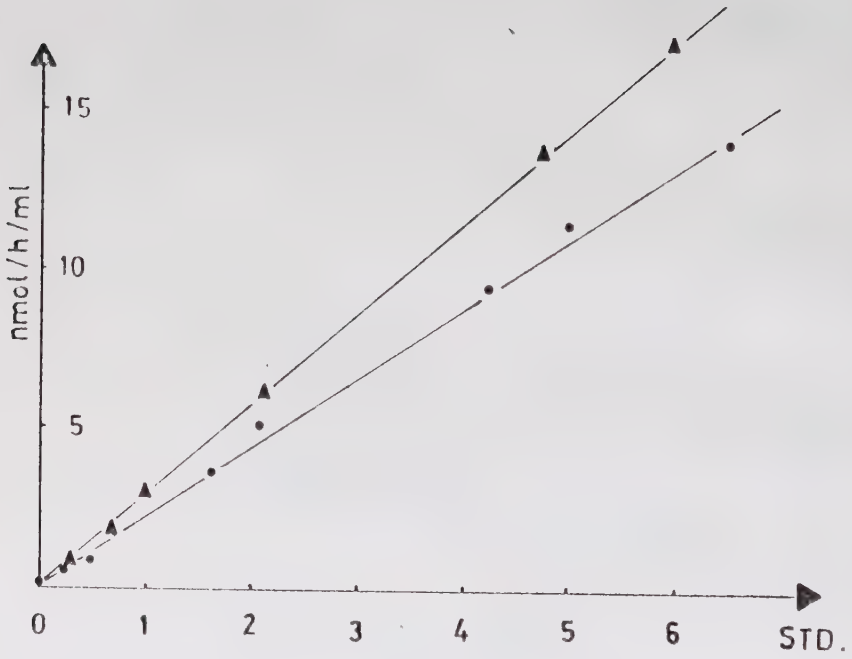


Abb. 3

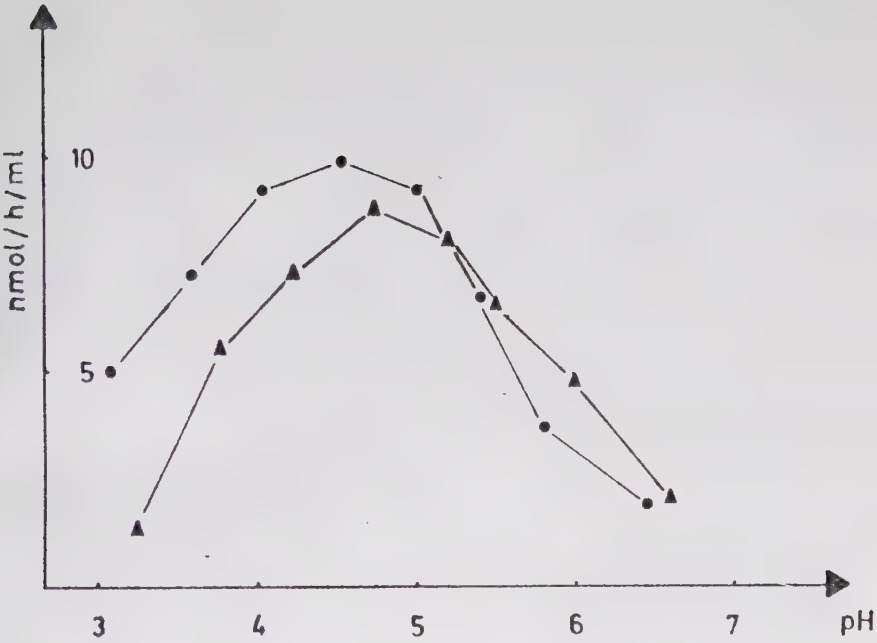


Abb. 4

Abb. 5

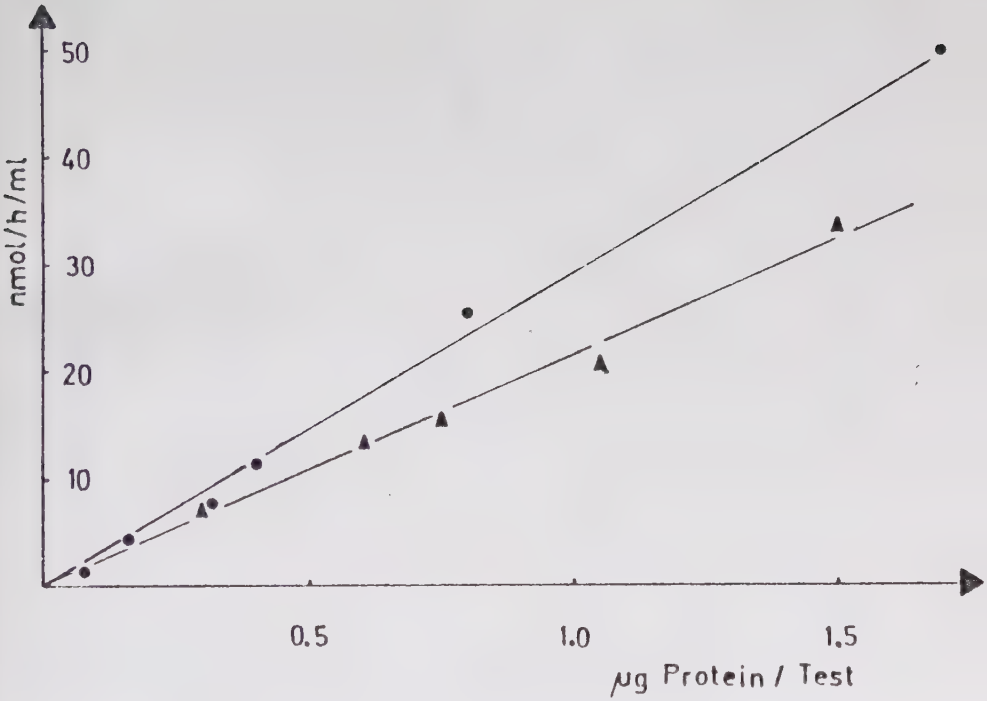


Abb. 6

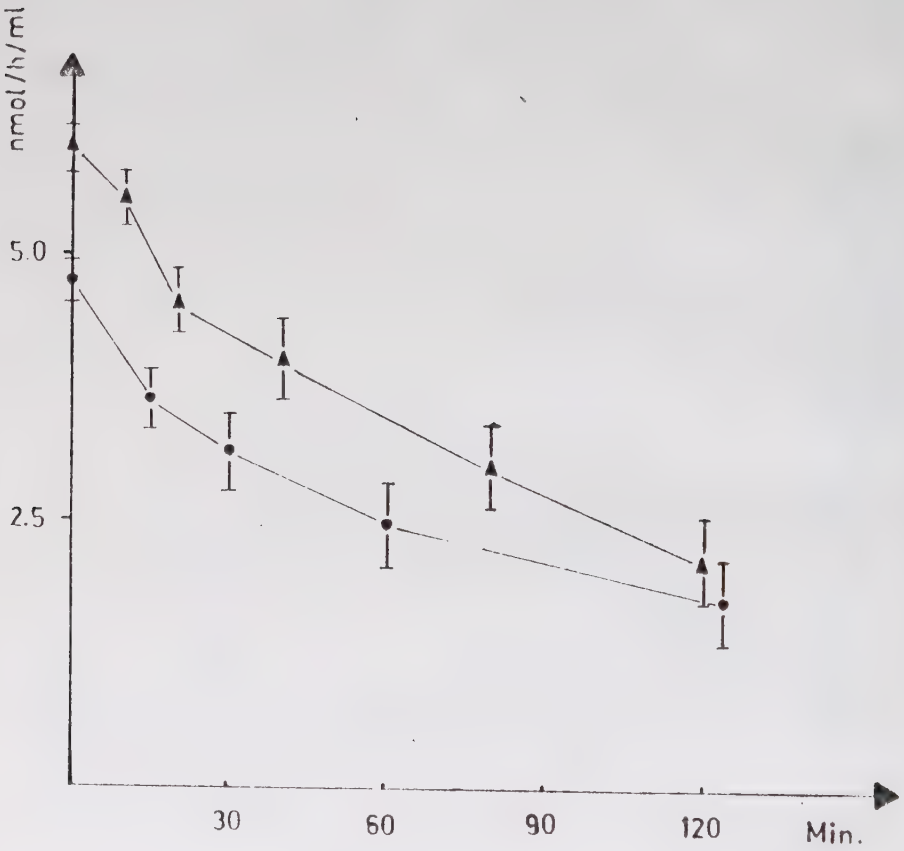


Abb. 7

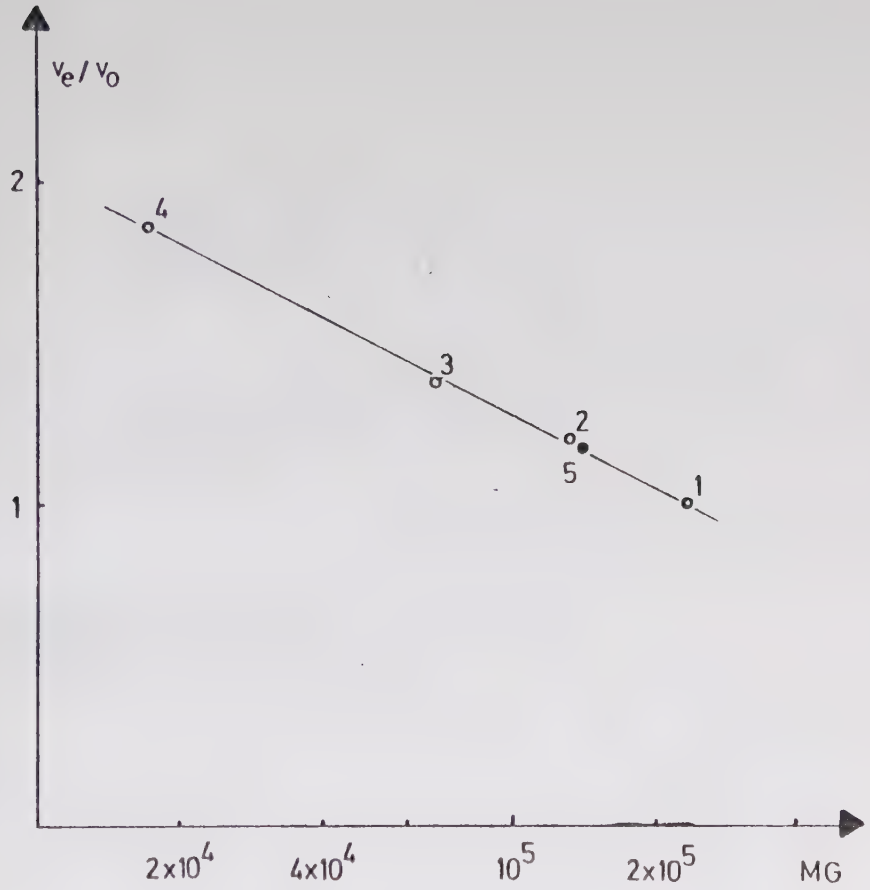


Abb. 8

Abb. 3: Zeitabhängigkeit der SM-Reaktion bei Kontroll- (●———●) und NPC-Gewebe (▲———▲).

Es wurde eine Reaktionskinetik über einen Zeitraum von 6 Stunden aufgenommen, wobei die Reaktions- und Testbedingungen denen unter 2.2.1. beschriebenen entsprechen.

Abb. 4: pH-Abhängigkeit der SM-Reaktion bei Kontroll- (●———●) und NPC-Gewebe (▲———▲).

Mit den gleichen Testbedingungen, wie sie unter 2.2.1. ausführlich beschrieben sind, wird die Abhängigkeit der SM-Reaktion aus beiden Geweben in dem pH-Bereich von 3 - 7 getestet.

Abb. 5: Lineweaver-Burk-Plot zur Ermittlung der scheinbaren K_M-Werte der SM aus Kontroll- (●———●) und NPC-Gewebe (▲———▲).

Die K_M-Werte betragen für die SM aus Kontrollgewebe $(0.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ M und für die SM aus NPC-Gewebe $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ M.
Die Testbedingungen sind die gleichen, wie unter 2.2.1. beschrieben, ausgenommen die Substratkonzentrationen, die über einen Bereich von 0.008 - 0.16 mM variiert wurden.

Abb. 6: Proteinabhängigkeit der SM-Reaktion bei Kontroll- (●———●) und NPC-Gewebe (▲———▲).

Auch in der Abhängigkeit vom Protein in einem Bereich von 0.32 - 12 /ug/Test, zeigt die SM beider Gewebe gleiches und lineares Verhalten.
Die Testbedingungen sind, bis auf die variierten Proteinkonzentrationen, die gleichen, wie unter 2.2.1. beschrieben.

Abb. 7: Hitzestabilität der SM aus Kontroll- (●———●) und NPC-Gewebe (▲———▲), durchgeführt bei 50°C im Wasserbad.

Versuchsansatz: 20 /ul Enzym
(je Meßpunkt) + 100 /ul 0.1 M Na-Acetat-Puffer, pH 5.0, 0.1 %ig an Triton X-100;

Testansatz: Für den Testansatz wird das Substrat, wie unter 2.2.1. beschrieben, vorbereitet und anschließend 120 /ul Versuchsansatz zu diesem Substrat gegeben.

Beide Hitzestabilitätskurven resultieren aus Doppelbestimmungen mit einer maximalen Schwankungsbreite bei den 120-Minuten-Werten.

50 % der Anfangsenzymaktivität der SM aus Kontrollgewebe sind nach (60 ± 10) Minuten erreicht und bei der SM aus NPC-Gewebe nach (80 ± 10) Minuten.

Abb. 8: Molekulargewichtsbestimmung der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe mit Sephadex LH-60 Gelfiltration.
Das scheinbare Molekulargewicht der SM (5) entspricht nahezu dem der ß-Hexosaminidase und beträgt ca. 140000. Wie Abb. 8 zeigt, besteht also die Möglichkeit, mit Sephadex LH-60 und allgemein gebräuchlichen Referenzproteinen Molekulargewichtsbestimmungen durchzuführen.

Tabelle 3:

	Kontroll-	NPC-Gewebe
Zeitabhängigkeit (bis 6^h) siehe Abb. 3	linear	linear
pH-Optimum siehe Abb. 4	4.5 (Schulter bei 5.3)	4.3 - 5.3 (Plateau)
app. K_M-Wert siehe Abb. 5	$(0.9 \pm 0.2)x10^{-4}M$	$(1.2 \pm 0.2)x10^{-4}M$
Proteinabhängigkeit (0.32 - 12 µg/ml Test) siehe Abb. 6	linear	linear
Hitzestabilität (50 % der Anfangsaktivität bei 50°C nach: siehe Abb. 7	(60 ± 10) Min.	(80 ± 10) Min.
Molekulargewicht (scheinb.) siehe Abb. 8	140000	140000

3.5. Untersuchungen zur Substratspezifität der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe

Wie in der Einleitung schon angedeutet, sind in den letzten Jahren eine Reihe künstlicher, meist chromogener Substrate für die SM synthetisiert worden. Natürliche Substanzen mit Substratwirkung sind, außer dem ^{3}H- und ^{14}C-markierten Sphingomyelin nicht bekannt.

Das 2-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-Phosphorylcholin und die Methylumbelliferylderivate haben wir auf ihre Substratwirkung hin getestet und einerseits, im Vergleich zu den radioaktiv-markierten natürlichen Substraten, schlechtere Aktivitätsausbeuten und schlechtere Reproduzierbarkeit festgestellt und andererseits keine Unterschiede der Substratspezifität zwischen der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe gefunden.

4. Diskussion

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, konnte die SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe um Faktoren von 90 bzw. 50 gegenüber dem Rohextrakt angereichert werden. Von Gelfiltrationsmethoden mit Sephadex G-200, Sephadex G-100 und Sephadex LH-60 waren nur mit Sephadex LH-60 zufriedenstellende Ergebnisse zu erreichen, d. h., es konnten mit dieser Methode noch Anreicherungen durchschnittlich um den Faktor 2 - 3 erreicht werden. Bei den beiden anderen Gelen traten zu große Enzymverluste ein. Das LH-60 Gel wurde zur Chromatographie von sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Proteinen entwickelt und scheint Vorteile bei der Trennung von (amphiphilen?) Lipidhydrolasen zu haben.

Sephadex G-200-Filtration war auch bei höherer Detergenskonzentration (bis 0.5 % Triton X-100) nicht möglich. Durch Wechsel des Trägermaterials von Dextrangelen (Sephadex) zu Polyacrylamidgelen (Bio-Rad), von denen Bio-Gel P-150 getestet wurde, konnten ebenfalls keine besseren Erfolge erzielt werden.

Darüberhinaus erfolglos, noch höhere Reinigung der SM zu erzielen, blieben Versuche mit sauren, CM-Sephadex C-50 und basischen, DEAE-Sephadex A-50, Ionenaustauschern. Dabei war die SM unter folgenden Bedingungen nicht mehr vom Trägermaterial eluierbar:

DEAE-Sephadex A-50: 0.05 M Phosphat-Puffer, pH 7.0
0.2 %ig an Triton X-100
0.0 - 0.5 M NaCl-Gradient

DEAE-Cellulose Cellex D: 0.05 M Phosphat-Puffer, pH 7.0,
0.1 %ig an Triton X-100,
0.0 - 0.5 M NaCl-Gradient,

CM-Sephadex C-50: 0.05 M Phosphat-Puffer, pH 5.0,
0.2 %ig an Triton X-100;
0.0 - 0.5 M NaCl-Gradient;

Aufgrund dieser Schwierigkeiten versuchten wir eine Molekulargewichtsbestimmung auf der Sephadex LH-60 Säule (0.8 x 80 cm), und wie Abbildung 8 zeigt, ist trotz der hohen Molekulargewichte der aufgetragenen Proteine eine Auftrennung möglich, so daß die formale Ausschlußgrenze von MG 60000 nicht unbedingt wirksam zu sein scheint. Eine lineare Kurve bei halblogarithmischer Auftragung ist ebenfalls fraglich. Wir meinen jedoch, daß der Versuch von Abb. 8 für eine vorläufige, ungefähre Aussage über das Molekulargewicht der SM nützlich ist, solange für eine konventionelle Gelchromatographie kein geeignetes Trägermaterial verfügbar ist. Danach liegt das scheinbare Molekulargewicht der SM ziemlich genau bei dem der ß-Hexosaminidase und beträgt 140000 (Sandhoff und Wässle, 1971).
Diese Gelfiltration und der Zentrifugationsversuch, zum Ausschluß einer partikelgebundenen Form der SM, zeigen, daß die SM, wie die ß-Hexosaminidase (Sandhoff und Wässle, 1971), in einer molekularen Form vorliegt, die unter den Bedingungen der Gelfiltration mit Sephadex LH-60 abtrennbar und unter Zentrifugations-

bedingungen von 210000 x g/ 2 Std., bis auf 2 %, nicht sedimentierbar ist.
Wie Tabelle 2 zeigt, konnten bei den gemessenen Parametern keine wesentlichen Unterschiede zwischen gereinigter SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe gefunden werden. Die unterschidlichen K_M-Werte der SM aus beiden Geweben liegen noch im Bereich der methodenbedingten Fehlerbreite der Meßwerte.

In Fortsetzung zu der in der Einleitung schon erwähnten Arbeit von Harzer et al., 1977, kann auch mit dieser Arbeit die Theorie, daß der M. Niemann-Pick Typ C auf dem Defekt bzw. Fehlen von Isoenzymen beruhe (Callahan et al., 1974), nicht bestätigt werden.

Die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry haben wir wegen der Störanfälligkeit gegenüber Triton X-100, Mercaptoäthanol u.a., und wegen zu geringer Empfindlichkeit nicht benutzt; unsere Endfraktionen enthalten nur ca. 5 /ug Protein/ ml.

Mit der hier beschriebenen SM-Reinigungsmethode ist auch eine geringe Anreicherung der sauren ß-Galaktosidase, der Arylsulfatase A und der ß-Hexosaminidase möglich. Mit Extraktaktivitäten von 0.2 - 0.5 /uMol/h/mg Protein für die saure ß-Galaktosidase, ca. 3.0 /uMol/h/mg Protein für die ß-Hexosaminidase und 0.1 - 0.3 /uMol/h/mg Protein für die Arylsulfatase A, sind diese Enzyme um Faktoren von respektive 25, 50 und 100 - 150 (bezogen auf das Homogenat) mitangereichert worden (Vergl. S. 27).

Um diese Enzyme als Verunreinigung von der SM abzutrennen, sind ein spezifisches Affinitätsgel für die SM oder zumindest Ionenaustauscher notwendig, wobei die letzteren jedoch, wie schon erwähnt, unter veröffentlichten und auch selbst variierten Bedingungen nicht erfolgreich sind.

Auftretende Schwankungen der spezifischen Aktivitäten der Endfraktionen bei den einzelnen Parameteruntersuchungen, sind bedingt durch den relativ schnellen Verlust der SM-Aktivität in den gereinigten Fraktionen. Nach ca. 6 - 8 Wochen sind, selbst bei Lagerung unter - 10°C nur noch 50 % der Ausgangsaktivität vorhanden.

5. Zusammenfassung

Aus normalem und pathologischem menschlichem Hirngewebe (M. Niemann-Pick Typ C) wurde saure Sphingomyelinase EC 3.1.4.12 90- bzw. 50-fach gegenüber dem Rohextrakt gereinigt.

Die spezifischen Aktivitäten der Sphingomyelinase der beiden höchsten Anreicherungsstufen betrugen für das Kontrollgewebe 1663 mU/mg Protein und für das pathologische Gewebe 994 mU/mg Protein, gemessen unter folgenden Testbedingungen:

0.1 M Na-Acetat-Puffer, pH 5.0
0.1 %-ig an Triton X-100
83 /uM Sphingomyelin

Anhand der pH-Abhängigkeit, des K_M-Wertes, der Zeitabhängigkeit, Protein-Konzentrationsabhängigkeit, der Hitzestabilität und des Molekulargewichtes wurden die Enzyme aus beiden Geweben verglichen. Es findet sich kein Unterschied zwischen der Sphingomyelinase aus Kontroll- und der aus Niemann-Pick-Typ-C-Gewebe.

Die ermittelten scheinbaren K_M-Werte für die SM aus Kontroll- und Niemann-Pick-Typ-C-Gewebe betragen: $(0.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ M bzw. $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ M mit $v_{max.}$-Werten von 11.1 nMol/h bzw. 7.7 nMol/h.

Das scheinbare Molekulargewicht der SM aus beiden Ge-

weben, ermittelt mit Sephadex LH-60-Gelfiltration, beträgt 140000.

Aufgrund des Vergleichs der Eigenschaften und der Parameter der SM aus Kontroll- und NPC-Gewebe ergibt sich keinerlei Argument dagegen, daß es sich in beiden Fällen um dasselbe Enzym handelt. Endgültig wird die Frage dann zu beantworten sein, wenn es möglich wird, die SM hochgradig zu reinigen und man in der Lage ist, Strukturaufklärung zu betreiben, sei es mit Hilfe verschiedener physikalischer Methoden oder auch durch spezifische Proteinspaltungsmuster der SM oder ihrer etwaigen Untereinheiten.

Literatur

1. Baier, W.: (1977) Diplomarbeit, Uni. Tübingen
2. Baraton, G.und Revol, A.: (1977) Clin. Chim. Acta 76, 339 - 343
3. Baum, H. et al.: (1959) Clin. Chim. Acta 4, 453 - 455
4. Besley, G.T.N.: (1976) FEBS-Letters 72, 101 - 104
5. Brady, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B. und Fredrickson, D.S.: (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 366 - 369
6. Callahan, J.W., Khalil, M., Gerrie, J.: (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 58, No. 2, 384 - 390
7. Callahan, J.W., Khalil, M. und Philippart, M.: (1975) Pediatric Res. 9, 908 - 913
8. Callahan, J.W. und Khalil, M.: (1975) Pediatric Res. 9 914 - 918
9. Cooper, G.V., Yedgar, S. und Barenholz, Y.: (1974) Biochem. Biophys. Acta 363, 86 - 97
10. Crocker, A.C.: (1961) J. Neurochem. 7, 69 - 80
11. Dacremont, G., Kint, J.A., Carton, D., Cocquyt, G.: (1974) Clin. Chim. Acta 52, 365 - 367
12. Fensom, A.H., Benson, P.F., Babarik, A. W., Grant, A.R und Jacobs, L.: (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, No. 3, 877 - 883
13. Fredrickson, D.S. und Sloan, H.R.: (1972) The metaboli basis of inherited disease, J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson, eds., New York etc.: Mc. Graw-Hill (3rd ed.) 783 - 807

14. Gal, A.E., Brady, R.O., Hibbert, S.R., Pentchev, P.G.: (1975) New Engl. J. Med. 293, 632 - 636

15. Gatt, S., Dinur, T. und Barenholz, Y.: (1978) Biochem. Biophys. Acta 530, 503 - 507

16. Harzer, K., Sandhoff, K.: (1971) J. Neurochem. 18, 2041 - 2050

17. Harzer,K. und Benz, H.U.: (1973) J. Neurochem. 21, 999 - 1001

18. Harzer, K.: (1977) Hum. Genet. 35, 193 - 196

19. Harzer, K., Anzil, A.P., Schuster, I.: (1977) J. Neurochem. 29, 1155 - 1157

20. Harzer, K., Schlote, W., Peiffer, J., Benz, H.U. und Anzil, A.P.: (1978) Acta neuropath. 43, 97 - 104

21. Heinzel, W.: (1960) Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med., 66. Kongreß, 636 - 673

22. Kanfer, J.N., Young, O.M., Shapiro, D. und Brady. R.O. (1966) J. Biol. Chem., 241, No. 5, 1081 - 1084

23. Karpati, G., Carpenter, S., Wolfe, L.S., Andermann, F. (1977) Neurology 27, 32 - 42

24. Lineweaver, M. und Burk, D.: (1934) J. Am. Chem. Soc. 658 - 666

25. Oppenheimer. D.R., Norman, R.M., Tingey, A.F.: (1967) J. Neurol. Sci. 5, 575 - 588

26. Pentchev, P.G., Brady, R.O., Gal, A.E. und Hibbert, S.R (1977) Biochem. Biophys. Acta 488, 312 - 321

27. Philippart, M., Martin, L., Martin, J.-J., Menkes, J.H (1969) Arch. Neurol. 20, 227 - 238

28. Rao, B.G. und Spence, M.W.: (1976) L. Lip. Res., 17, No. 5, 506 - 515

29. Sandhoff, K. und Wässle, W.: (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1119 - 1133

30. Schaffner, W. und Weissmann, C.: (1973) Anal. Biochem. 56, 502 - 514

31. Schneider, P.B. und Kennedy, E,P.: (1967) J. Lip. Res. 8, 202 - 209

32. Sloan, R.H.: (1972) Methods Enzymol. 28, 874 - 879

33. Yamaguchi, S. und Suzuki, K.: (1977) J. Biol. Chem. 252, No. 11, 3805 - 3813

34. Yamaguchi, S. und Suzuki, K.: (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, No. 3, 999 - 1003

35. Yamaguchi, S. und Suzuki, K.: (1978) J. Biol. Chem. 253, No. 12, 4090 - 4092

36. Yedgar, S., Barenholz, Y. und Cooper, G.V.: (1974) Biochem. Biophys. Acta 363, 98 - 111

37. Yedgar, S., Herz, R. und Gatt, S.: (1975) Chem. Phys. Lipids 13, 404 - 414

38. Yedgar, S. und Gatt, S.: (1976) Biochemistry 15, No. 12, 2570 - 2573

Lebenslauf

Am 11. 5. 1951 wurde ich, Helmut Müller, in Niederlahnstein (Rheinland-Pfalz) als zweiter Sohn des Fernmelde-Betriebsinspektors Clemens Müller und seiner Ehefrau Käthe, geborene Kauth, geboren.

Nach der Volksschule, von 1957 bis 1962, und nach der Realschule, 1962 bis 1967, besuchte ich von 1967 bis 1970 den naturwissenschaftlichen Zweig des Max-von-Laue-Gymnasiums in Koblenz.

Nach der Reifeprüfung begann ich im WS 1970/71 in Tübingen mit dem Studium der Biologie und wechselte im SS 1971 zum Biochemiestudium in Tübingen. Nach einem Aufenthalt an der Universität München vom SS 1974 bis WS 1974/75, legte ich im April 1977 meine Diplomprüfung in Physiologischer Chemie an der Universität Tübingen mit dem Thema:
"Untersuchungen zur Hemmung der IMP-Dehydrogenase (EC 1.2.1.14) durch Imidazolnucleoside" ab.

Seit Juli 1977 bin ich als Wiss. Angestellter am Institut für Hirnforschung (Direktor: Prof. Dr. J. Peiffer) an der Universität Tübingen beschäftigt, und fertigte hier bis zum Sommer 1979 meine Dissertation über das Thema: "Teilreinigung und Charakterisierung der sauren Sphingomyelinase (EC 3.1.4.12) aus normalem und pathologischem (M. Niemann-Pick Typ C) menschlichem Hirngewebe", unter direkter Anleitung von Prof. Dr. K. Harzer an.

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie	:	K. Mörike
Anorganische Chemie	:	W. Rüdorff
Botanik	:	H. Metzner
Organische Chemie	:	E. Bayer, H. Hagenmaier
Physik	:	H. Krüger
Physikalische Biochemie	:	K. Wegmann
Physikalische Chemie	:	H. Mauser
Physiologische Chemie	:	G. Weitzel, D. Mecke, U. Weser
		H. Guglielmi
Zoologie	:	K. G. Grell